

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 64-010996

(43)Date of publication of application : 13.01.1989

(51)Int.Cl.

C12P 17/04
//C12P 17/04
C12R 1:06)
(C12P 17/04
C12R 1:66)
(C12P 17/04
C12R 1:07)
(C12P 17/04
C12R 1:645)
(C12P 17/04
C12R 1:13)
(C12P 17/04
C12R 1:15)
(C12P 17/04
C12R 1:265)
(C12P 17/04
C12R 1:365)
(C12P 17/04
C12R 1:80)
(C12P 17/04
C12R 1:38)
(C12P 17/04
C12R 1:78)

(21)Application number : 62-093275

(71)Applicant : IDEMITSU KOSAN CO LTD

(22)Date of filing : 17.04.1987

(72)Inventor : MURAKAMI NOBUO

(30)Priority

Priority number : 62 24711 Priority date : 06.02.1987 Priority country : JP

(54) PRODUCTION OF ALPHA-HYDROXY-BETA,BETA-DIMETHYL-GAMMA-BUTYROLACTONE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the titled compound useful as a raw material for synthesizing pantothenic acid useful as a drug industrially and advantageously, by hydrolyzing α,γ -dihydroxy- β,β -dimethyl- γ -butyronitrile by using a microorganism belonging to the genus *Arthrobacter*.

CONSTITUTION: One or more microorganism belonging to the genus *Arthrobacter*, *Aspergillus*, *Bacillus*, *Bacteridium*, *Brevibacterium*, *Cochliobolus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Noctidia*, *Penicillium*, *Pseudomonas* or *Fusarium*, capable of hydrolyzing α,γ -dihydroxy- β,β -dimethyl- γ -butyronitrile are brought into contact with α,γ -dihydroxy- β,β -dimethyl- γ -butyronitrile to give the aimed compound.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or

Best Available Copy

application converted [registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭64-10996

⑪ Int. Cl.⁴
C 12 P 17/04

識別記号

庁内整理番号
2104-4B※

⑬ 公開 昭和64年(1989)1月13日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全8頁)

⑭ 発明の名称 α -ヒドロキシ- β , β -ジメチル- γ -ブチロラク톤の製造法

⑮ 特 願 昭62-93275

⑯ 出 願 昭62(1987)4月17日

優先権主張 ⑰ 昭62(1987)2月6日 ⑱ 日本(JP) ⑲ 特願 昭62-24711

⑳ 発 明 者 村 上 信 雄 千葉県君津郡袖ヶ浦町上泉1205番地の123

㉑ 出 願 人 出光興産株式会社 東京都千代田区丸の内3丁目1番1号

㉒ 代 理 人 弁理士 久保田 藤郎

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

α -ヒドロキシ- β , β -ジメチル- γ -
ブチロラク톤の製造法

2. 特許請求の範囲

(1) アースロバクター(*Arthrobacter*)属、アスペルギルス(*Aspergillus*)属、バチルス(*Bacillus*)属、バクテリジウム(*Bacteridium*)属、ブレヴィバクテリウム(*Brevibacterium*)属、コクリオボラス(*Cochliobolus*)属、コリネバクテリウム(*Corynebacterium*)属、マイクロコッカス(*Micrococcus*)属、ノカルディア(*Nocardia*)属、ペニシリウム(*Penicillium*)属、シュードモナス(*Pseudomonas*)属およびフザリウム(*Fusarium*)属のうちのいずれかに属し、 α , γ -ジヒドロキシ- β , β -ジメチル-ブチロニトリルを加水分解する能力を有する微生物の1種または2種以上を α , γ -ジヒドロキシ- β , β -ジメチル-ブチロニトリルに投与させることを特徴とする α -ヒドロキシ-

- β , β -ジメチル- γ -ブチロラク톤の製造法。

(2) 微生物が増殖期の菌体、休止期の菌体、固定化菌体および菌体抽出処理物のうちのいずれかである特許請求の範囲第1項記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は α -ヒドロキシ- β , β -ジメチル- γ -ブチロラク톤の製造法に関し、詳しくは特定の微生物を利用して α , γ -ジヒドロキシ- β , β -ジメチル-ブチロニトリルから α -ヒドロキシ- β , β -ジメチル- γ -ブチロラク톤を製造する方法に関する。

〔従来の技術および発明が解決しようとする問題点〕

α -ヒドロキシ- β , β -ジメチル- γ -ブチロラク톤は医薬品として有用なバントテン酸およびその誘導体の合成原料として知られている。従来の α -ヒドロキシ- β , β -ジメチル- γ -ブチロラク톤の製造法は、イソブチルアルデヒ

ドおよびホルムアルデヒドを炭酸カリウムなどの塩基性触媒でアルドール縮合し、次いで苛酸でシアンヒドリン化して得られる α 、 γ -ジヒドロキシ- β 、 β -ジメチル-ブチロニトリルを硫酸、硫酸などの鉱酸を用いて加水分解する方法(特公昭52-39032, 特開昭49-26270)が知られている。

しかし、この方法では加水分解の際に苛酸が発生したり、鉱酸として硫酸を用いると、副反応として脱水反応が生じ、収率が低下するなどの欠点があり、 α -ヒドロキシ- β 、 β -ジメチル- γ -ブチロラクトンを効率よく製造することが困難であった。

【問題点を解決するための手段】

そこで本発明者は、微生物を利用して α 、 γ -ジヒドロキシ- β 、 β -ジメチル-ブチロニトリルから α -ヒドロキシ- β 、 β -ジメチル- γ -ブチロラクトンを効率よく製造する方法を開発すべく検討したところ、特定の微生物を選択して用いることにより α 、 γ -ジヒドロキシ- β 、 β -ジメチル-ブチロニトリルから α -ヒドロキシ-

属し、 α 、 γ -ジヒドロキシ- β 、 β -ジメチル-ブチロニトリルを加水分解する能力を有する微生物であればよく、具体的にはアースロバクター・アウレセンス(*Arthrobacter aurecens*) (IAM 12340)、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*) (JCM 1925 および JCM 2261)、バチルス・エスピー(*Bacillus* sp.) (CBS 494.74)、バクテリジウム・エスピー(*Bacteridium* sp.) B341 (CBS 496.74)、ブレヴィバクテリウム・インペリアル(*Brevibacterium imperiale*) B222 (CBS 496.74)、コクリオボラス・ミヤベアヌス(*Cochliobolus miyabeanus*) (OUT 2074)、コリネバクテリウム・ニトリロフィラス(*Corynebacterium nitrilophilus*) (ATCC 21419)、マイクロコッカス・エスピー(*Micrococcus* sp.) A111 (CBS 497.74)、ノカルディア・エリスロポリス(*Nocardia erythropolis*) (IFO 12320)、ペニシリウム・クリソゲナム(*Penicillium crysogenum*) (IFO 5473)、シュードモナス(*Pseudomonas* sp.) MY-1 (FERM P-9174)、フザリウム・エスピー(*Fusarium* sp.) MY-2 (FERM

β 、 β -ジメチル- γ -ブチロラクトンを温和な条件下で効率よく製造できることを見出し、かかる知見に基づいて本発明を完成したのである。

すなわち本発明は、アースロバクター(*Arthrobacter*)属、アスペルギルス(*Aspergillus*)属、バチルス(*Bacillus*)属、バクテリジウム(*Bacteridium*)属、ブレヴィバクテリウム(*Brevibacterium*)属、コクリオボラス(*Cochliobolus*)属、コリネバクテリウム(*Corynebacterium*)属、マイクロコッカス(*Micrococcus*)属、ノカルディア(*Nocardia*)属、ペニシリウム(*Penicillium*)属、シュードモナス(*Pseudomonas*)属およびフザリウム(*Fusarium*)属のうちのいずれかに属し、 α 、 γ -ジヒドロキシ- β 、 β -ジメチル-ブチロニトリルを加水分解する能力を有する微生物の1種または2種以上を α 、 γ -ジヒドロキシ- β 、 β -ジメチル-ブチロニトリルに接触させることを特徴とする α -ヒドロキシ- β 、 β -ジメチル- γ -ブチロラクトンの製造法に関する。

本発明に使用できる微生物は、上記各種の属に

P-9187)、フザリウム・エスピー(*Fusarium* sp.)

MY-3 (FERM P-9188)などを挙げることができ、これらを単独でもしくは2種以上を組合せて用いることができる。なお、上記微生物のうちシュードモナス属およびフザリウム属に属するものは発明者により単離された新菌株である。以下に、これらの微生物の菌学的性質を示す。

シュードモナス・エスピー MY-1

(1) 形態

細胞の形及び大きさ	短桿菌
	0.7 ~ 0.9 × 0.8 ~ 1.4 μ m
細胞の多形性の有無	なし
胞子の有無	なし
グラム染色性	陰性
運動性	有り
鞭毛	極鞭毛(1)

(2) 培地における生育状態

肉汁寒天平板培養	大きさ 4 ~ 4.5mm 円形
	全縁、円滑、不透明で
	光沢を有する

肉汁寒天斜面培養 生育良好 表面円滑

半透明で光沢あり

肉汁寒天液体培養 濁り強く、甘味臭あり

リトマスミルク アルカリ化

(3) 生理学的性質

生育条件

温度 (最適温度) 5 ~ 40℃ (20 ~ 37)

pH (最適 pH) 4.5 ~ 9.5 (4.5 ~ 9.0)

酸素に対する態度 絶対好気性

無機窒素の利用性 アンモニウム塩、硝酸塩

カタラーゼ +

オキシダーゼ +

O-Fテスト 反応せず

ゼラチンの加水分解 -

デンプンの加水分解 -

カゼインの加水分解 +

セルロースの加水分解 -

インドールの生成 -

VRテスト -

MRテスト -

H₂S の生成 -

糖から酸およびガス生成

キシロース -

アラビノース -

グルコース 酸

フルクトース -

マンノース -

ガラクトース -

スクロース -

ラクトース -

マルトース -

トレハロース -

マンニトール -

ソルビトース -

イノシトール -

クエン酸の利用性 +

硝酸塩還元 -

脱窒反応 -

色素の生成 黄 (King A 培地, King B 培地)

以上のように、本菌は短鞭毛を有する桿菌で

あって、グラム陰性、絶対好気性、カタラーゼとオキシダーゼに陽性であることからシュードモナス属に属する細菌であると同定した。本菌は工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されており、その受託番号はFERM P-9174 である。

フザリウム・エスビエー MY-2

(1) 各種培地での生育温度および培養コロニーの性状

培地	寒天 (M.P.G)	寒天 (P.D.A)	寒天 (P.C.A)	寒天 (C.A)
生育	33℃	33℃	33℃	33℃
表面の状況	広く拡大的	広く拡大的	広く拡大的	広く拡大的
気性菌糸	極めて抑制的	極めて抑制的	抑制的	抑制的
菌糸	綿毛状	綿毛状	綿毛状	綿毛状
中心部	盤	散	マット状	マット状
菌糸	マット状	マット状	マット状	マット状
菌糸	白	白	白	白
表面	中心付近薄緑色	全体に薄緑色	全体に薄緑色	全体に薄緑色
裏面	中心部赤緑色	中心部赤緑色	全体に薄緑色	全体に薄緑色
硬さ	軟	軟	軟	軟
粘り	なし	なし	なし	なし

(2) 顕微鏡的特徴

栄養菌糸のサイズ	幅 1 ~ 3 μ
隔壁	有
かすがい連結	なし
菌核	なし
分生子	有
分生子形成の型	フィアロ型
大分生子形	新月形
大分生子サイズ	3 ~ 5 μ × 20 ~ 35 μ
大分生子隔壁数	3 ~ 5 隔壁
小分生子形	長ダ円形
小分生子サイズ	2 ~ 3 μ × 5 ~ 7 μ
小分生子隔壁数	なし
厚膜胞子形	球状形
厚膜胞子サイズ	3 ~ 4 μ

C A 培地 23℃ 7 日間培養

スライド培養法

(3) 生育環境

生育温度範囲	15℃ ~ 39℃
生育不適温度	10℃ 以下および 42℃ 以上
最適生育温度	23℃ ~ 25℃
生育 pH 温度	pH 2 ~ pH 10
最適生育 pH	pH 5 以上

M P G 培地 7 日間培養

(4) フェノールオキシダーゼ反応

菌 株 名	SI-8
フェノール・オキシダーゼ反応 ^{a)}	陰 性
ラッカーゼの分泌 ^{b)}	陽 性
チロシナーゼの分泌 ^{c)}	陰 性

a) M P G 培地 + 0.1 % タンニン酸

b) ジャガイモ寒天 + 0.0005 M ナフトール

c) ジャガイモ寒天 + 0.1 % クレゾール

フザリウム・エスビー-WY-3

(1) 各種培地での生育温度および培養コロニーの特徴

培地	栄養菌糸のサイズ	隔壁	かすがい連結	菌核	分生子	分生子形成の型	大分生子形	大分生子サイズ	大分生子隔壁数	小分生子形	小分生子サイズ	小分生子隔壁数	厚膜胞子形	厚膜胞子サイズ
23℃	幅 1 ~ 3 μ	有	なし	なし	有	フィアロ型	ラグビーボール型	3 ~ 4 μ × 10 ~ 15 μ	2 隔壁	ラグビーボール型	2 ~ 4 μ × 8 ~ 10 μ	なし	球状形 (多産)	5 μ
37℃	幅 1 ~ 3 μ	有	なし	なし	有	フィアロ型	ラグビーボール型	3 ~ 4 μ × 10 ~ 15 μ	2 隔壁	ラグビーボール型	2 ~ 4 μ × 8 ~ 10 μ	なし	球状形 (多産)	5 μ
気性菌糸	幅 1 ~ 3 μ	有	なし	なし	有	フィアロ型	ラグビーボール型	3 ~ 4 μ × 10 ~ 15 μ	2 隔壁	ラグビーボール型	2 ~ 4 μ × 8 ~ 10 μ	なし	球状形 (多産)	5 μ
菌核	なし	なし	なし	なし	有	フィアロ型	ラグビーボール型	3 ~ 4 μ × 10 ~ 15 μ	2 隔壁	ラグビーボール型	2 ~ 4 μ × 8 ~ 10 μ	なし	球状形 (多産)	5 μ
色	なし	なし	なし	なし	有	フィアロ型	ラグビーボール型	3 ~ 4 μ × 10 ~ 15 μ	2 隔壁	ラグビーボール型	2 ~ 4 μ × 8 ~ 10 μ	なし	球状形 (多産)	5 μ
硬さ	なし	なし	なし	なし	有	フィアロ型	ラグビーボール型	3 ~ 4 μ × 10 ~ 15 μ	2 隔壁	ラグビーボール型	2 ~ 4 μ × 8 ~ 10 μ	なし	球状形 (多産)	5 μ
粘り	なし	なし	なし	なし	有	フィアロ型	ラグビーボール型	3 ~ 4 μ × 10 ~ 15 μ	2 隔壁	ラグビーボール型	2 ~ 4 μ × 8 ~ 10 μ	なし	球状形 (多産)	5 μ

(2) 顕微鏡的特徴

栄養菌糸のサイズ	幅 1 ~ 3 μ
隔壁	有
かすがい連結	なし
菌核	なし
分生子	有
分生子形成の型	フィアロ型
大分生子形	ラグビーボール型
大分生子サイズ	3 ~ 4 μ × 10 ~ 15 μ
大分生子隔壁数	2 隔壁
小分生子形	ラグビーボール型
小分生子サイズ	2 ~ 4 μ × 8 ~ 10 μ
小分生子隔壁数	なし
厚膜胞子形	球状形 (多産)
厚膜胞子サイズ	5 μ

C A 培地 23℃ 7 日間培養

スライド培養法

(3) 生育環境

生育温度範囲	15℃～39℃
生育不適温度	10℃以下および42℃以上
最適生育温度	23℃～25℃
生育pH温度	pH4～pH10
最適生育 pH	pH5 以上

M P G 培地 7日間培養

(4) フェノールオキシダーゼ反応

菌 株 名	MY-3
フェノールオキシダーゼ反応 ^{a)}	陰 性
ラッカーゼの分泌 ^{b)}	陽 性
チロシナーゼの分泌 ^{c)}	陰 性

a) M P G 培地 + 0.1 % タンニン酸

b) ジャガイモ寒天 + 0.0005 M ナフトール

c) ジャガイモ寒天 + 0.1 % クレゾール

以上のような菌学的性質を示したことからMY-2株およびMY-3株はいずれもフザリウム属に属する

ル、エチレングリコール、グリセリン等のアルコールなど供試菌が質化できるものが用いられる。また、窒素源としては肉エキス、ペプトン、コーンステープリカー、尿素、硝酸ナトリウムなどが用いられる。さらに必要に応じて、リン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩、銅塩、亜鉛塩などの無機塩類や微生物の生育に必要な栄養物質を培地に適宜加えることができる。なお、増殖期の菌体以外の菌体を用いる場合、上記培地に原料のニトリルの一部もしくは全部をアセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類またはアセトアミド、プロピオアミド、メタクリルアミドなどのアミド類に置換して添加することができる。

α、γ-ジヒドロキシ-β、β-ジメチル-β-チロニトリルは培地に最初から加えてもよく、培養を開始してから適当な時期に添加してもよい。また、その添加は一度に行なってもよく、あるいは数回に分割して行なってもよい。

上記微生物とα、γ-ジヒドロキシ-β、β-

カビであると同定した。MY-2株およびMY-3株は工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されており、その受託番号は前者がFERM P-9187、後者がFERM P-9188である。

微生物は様々な形態で使用する事ができ、たとえば増殖期の菌体、休止期の菌体、固定化された菌体などのいずれであってもよく、さらには微生物菌体からの抽出処理物であってもよい。ここで微生物の固定化は担体結合法、架橋法、包括法などの常法の固定化技術を用いて行なうことができる。また、抽出法としては微生物菌体の懸濁液を超音波、フレンチプレス、高圧ホモジナイザーなどにより破砕したのち遠心分離等によって可溶性抽出物を得る方法などを採用することができる。

上記の微生物を培養してα-ヒドロキシ-β、β-ジメチル-γ-β-チロラクトンを得るための培地としては、炭素源、窒素源となる物質を含む培地を用いることが必要である。炭素源としてはグルコース、シュクロース等の糖類やエタノール

β-ジメチル-β-チロニトリルとの反応は好氣的条件下および嫌氣的条件下のいずれで行なってもよく、使用する微生物の性質を考慮して適宜決定すればよい。なお、増殖期の菌体を培養しながら反応させる場合、5～80℃、好ましくは20～40℃の温度、pH4～10、好ましくは6～9の範囲で反応させることによりα、γ-ジヒドロキシ-β、β-ジメチル-β-チロニトリルからα-ヒドロキシ-β、β-ジメチル-γ-β-チロラクトンを製造することができる。また、増殖期の菌体以外の菌体を用いる場合は、0～40℃、好ましくは5～30℃の温度、pH4～11、好ましくは6～10の範囲で適当な時間反応させればよい。

さらに、上記培養法と休止菌体反応法を組合せたり、他の固定化菌体、菌体抽出処理物を単独で、もしくは上記培養法などと適宜組合せて行なうことも可能である。

本発明の方法は、原料のα、γ-ジヒドロキシ-β、β-ジメチル-β-チロニトリルに対し特定の微生物もしくは該微生物に由来する酵素を作用

させて加水分解させるものであり、反応によって生成する α -ヒドロキシ- β 、 β -ジメチル- γ -ブチロラクトンは常法により分離、精製すればよい。

[実施例]

次に、本発明を実施例により詳しく説明する。

実施例 1

ペプトン肉エキス寒天斜面培地上で30℃、24時間培養したノカルディア・エリスロポリス (*Nocardia erythropolis*) IFO 12320 の菌体1白金耳を、表1に示す組成の培地10mlに接種し、30℃で24時間培養した。培養終了後、培養液を10,000×gで6分間の条件で2回遠心分離することにより菌体を洗淨した。得られた菌体をpH8の1/15Mリン酸緩衝液2mlに懸濁した。これに α 、 γ -ジヒドロキシ- β 、 β -ジメチル- γ -ブチロニトリル10mgを添加し、22℃で5時間反応させた。反応終了後、遠心分離により除菌した液を高速度液体クロマトグラフィー(カラム: chiralcel OA, 溶出液: イソプロパノール; n-ヘキサン=

0.7mg/mlの d,l- α -ヒドロキシ- β 、 β -ジメチル- γ -ブチロラクトンが得られた。

実施例 3

ペプトン肉エキス寒天斜面培地上で30℃、24時間培養したブレヴィバクテリウム・インペリアル 8222 (*Brevibacterium imperiale*) CBS 498.74株1白金耳を、表2に示す組成の培地100mlに接種し、30℃で48時間培養した。培養終了後、培養液を10,000×gで8分間遠心分離することにより洗淨した。得られた菌体をpH8の1/15Mリン酸緩衝液10mlに懸濁した。これに α 、 γ -ジヒドロキシ- β 、 β -ジメチル- γ -ブチロニトリル50mgを添加し、22℃で5時間反応させた。反応終了後、実施例1と同様にして定量分析を行なったところ、3.0mg/mlの d,l- α -ヒドロキシ- β 、 β -ジメチル- γ -ブチロラクトンが得られた。

1:9)で定量分析を行なったところ、4.9mg/mlの d,l- α -ヒドロキシ- β 、 β -ジメチル- γ -ブチロラクトンが得られた。

表 1

グルコース	5	g
アセトニトリル	3	g
KH ₂ PO ₄	1.5	g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1.5	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.01	g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.001	g
酵母エキス	0.03	g
コーン・スティーブ・リカー	0.03	g

蒸留水で1Lにする。

実施例 2

実施例1の菌株に代えてコリネバクテリウム・ニトリロフィラス (*Corynebacterium nitrophilus*) ATCC 21419 を用いたこと以外は実施例1と同様に培養、反応を行なった。この結果、

表 2

グリセリン	5	g
アセトニトリル	5	g
KH ₂ PO ₄	0.5	g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	5	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.01	g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.001	g
酵母エキス	0.05	g
コーン・スティーブ・リカー	0.05	g

蒸留水で1Lにする。

実施例 4～8

実施例3において菌株を表3に示したものに変わったこと以外は、実施例3と同様に反応を行なった。この結果を表3に示す。

表 3

実施例	菌 株	d, l - α - ヒドロキシ - β, β - ジメチル - γ - ブチロラクトン 生産量 (mg/ml)
4	マイクロコッカス・エスビー A111 CBS 497.74	2.8
5	バチルス・エスビー CBS 494.74	2.2
6	バクテリウム・エスビー R341 CBS 496.74	3.1

実施例 7

実施例 1 において菌株アースロバクター・アウレセンス (*Arthrobacter aureocens*) IAM 12340 に変え、反応時間を 2 時間としたこと以外は実施例 1 と同様に培養、反応、定量を行なった。この結果、0.8mg/ml の d, l - α - ヒドロキシ - β, β - ジメチル - γ - ブチロラクトンが得られた。

実施例 8

ペプトン肉エキス寒天斜面培地で 30℃, 24 時間培養したアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus*

niger) JCM 1925 1 白金耳を、アセトニトリル 3g/g を含むツァベック培地 100ml に植菌し、30℃ で 6 日間培養した。培養終了後、培養液を 10,000 × g で 6 分間遠心分離することにより洗浄した。得られた菌体を pH 8 の 1/15M リン酸緩衝液 2ml に懸濁した。これに α, γ - ジヒドロキシ - β, β - ジメチル - ブチロニトリル 10mg を添加し、30℃ で 5 時間反応を行なった。反応終了後、実施例 1 と同様に定量分析を行なったところ、0.5mg/ml の d - α - ヒドロキシ - β, β - ジメチル - γ - ブチロラクトン (15% ee) が得られた。

実施例 9 ~ 11

実施例 8 において菌株を表 4 に示したものに変わったこと以外は、実施例 8 と同様に反応を行なった。この結果を表 4 に示す。

表 4

実施例	菌 株	d, l - α - ヒドロキシ - β, β - ジメチル - γ - ブチロラクトン 生産量 (mg/ml)
9	アスペルギルス・ニガー JCM 2261	0.3
10	ペニシリウム・クリソゲナム IFO 5473	0.6
11	コクリオボラス・ミヤベアヌス OUT 2074	0.1

実施例 12

ペプトン肉エキス寒天斜面培地上で 30℃, 24 時間培養したシュードモナス・エスビー (*Pseudomonas* sp.) MY-1 (FERM P-9174) の菌体 1 白金耳を、表 5 に示す組成の培地 100ml に植菌し、72 時間培養した。培養終了後、培養液を 10,000 × g で 6 分間の条件で 2 回遠心分離することにより菌体を洗浄した。得られた菌体を pH 8 の 1/15M リン酸緩衝液 15ml に懸濁し、これに α, γ - ジヒドロキシ - β, β - ジメチル - ブチロニトリル 750g を添

加し、22℃ で 5 時間反応させた。反応終了後、反応液から除菌したのち塩酸で pH 2 に調整し、酢酸エチルで抽出した液を実施例 1 と同様に定量分析を行なったところ、2.5mg/ml の d, l - α - ヒドロキシ - β, β - ジメチル - γ - ブチロラクトンが得られた。

表 5

グリセリン	5	g
アセトニトリル	5	g
KH ₂ PO ₄	1.5	g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	1.5	g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2	g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.01	g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.001	g
酵母エキス	0.05	g
コーンステープ・リカー	0.05	g

蒸留水で 1 l にする。

実施例 13 及び 14

実施例 12 において、菌株を表 6 に示したものに

変えたこと以外は実施例12と同様に反応を行なった。この結果を表6に示す。

表 6

実施例	菌 株	2- α -ヒドロキシ- β , β -ジメチル- γ - -ブチロラクトン 生産量 (ag/ml)
13	フザリウム・ エスビー MY-2 FERM P-9187	4.3 (23% ee)
14	フザリウム・ エスビー MY-3 FERM P-9188	5.1 (27% ee)

〔発明の効果〕

本発明によれば、 α 、 γ -ジヒドロキシ- β 、 β -ジメチル-ブチロニトリルから α -ヒドロキシ- β 、 β -ジメチル- γ -ブチロラクトンを特定の微生物を用いて温和な条件で効率よく製造することができる。得られた α -ヒドロキシ- β 、 β -ジメチル- γ -ブチロラクトンはバントテン酸等の医薬品の合成原料として有用である。

特許出願人 出光興産株式会社

代理人 弁理士 久保田 藤 郎



第1頁の続き

⑨Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

//(C 12 P 17/04
C 12 R 1:06)
(C 12 P 17/04
C 12 R 1:66)
(C 12 P 17/04
C 12 R 1:07)
(C 12 P 17/04
C 12 R 1:645)
(C 12 P 17/04
C 12 R 1:13)
(C 12 P 17/04
C 12 R 1:15)
(C 12 P 17/04
C 12 R 1:265)
(C 12 P 17/04
C 12 R 1:365)
(C 12 P 17/04
C 12 R 1:80)
(C 12 P 17/04
C 12 R 1:38)
(C 12 P 17/04
C 12 R 1:78)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.